

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker merupakan suatu penyakit yang dihasilkan dari peristiwa molekuler yang secara dasar terjadi perubahan sifat normal sel menjadi pertumbuhan sel yang tidak terkontrol. Pada sel kanker terjadi pertumbuhan sel yang berlebihan dan menginvasi jaringan sel lain (Alberts *et al.* 2008). Sampai saat ini kanker masih merupakan penyebab kematian utama, baik di negara maju maupun negara berkembang. Lebih dari 60% kasus baru dan sekitar 70% kematian akibat kanker di dunia setiap tahunnya terjadi di Afrika, Asia dan Amerika Tengah dan Selatan. Diperkirakan kasus kanker tahunan akan meningkat dari 14 juta pada 2012 menjadi 22 juta dalam dua dekade berikutnya (Torre *et al.*, 2015).

Berdasarkan estimasi Globocan, pada tahun 2012 di seluruh dunia terdapat sekitar 14,1 juta kasus baru dan 8,2 juta kematian akibat kanker (Torre *et al.*, 2015). Secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,45% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. (Pusdatin, Kemenkes 2013). Di Indonesia, kanker menjadi masalah kesehatan di masyarakat dengan prevalensi 4,3 per 1000 penduduk (Departemen kesehatan RI, 2009). Menurut Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT), kanker menempati urutan kelima sebagai penyebab kematian di Indonesia, dan angka kematian akibat kanker meningkat dari tahun ke tahun.

Kanker hati merupakan keganasan peringkat keenam di seluruh dunia dengan prognosis yang kurang baik, dan juga merupakan penyebab kematian ketiga dari kematian karena kanker, yaitu sebanyak 600,000 kematian pertahun (Parkin, *et al* 2002). Menurut data dari GLOBOCAN 2012, kanker hati lebih banyak menyerang jenis kelamin laki – laki daripada perempuan dan rasio insidensi terjadinya kanker hati pada laki laki : perempuan adalah : 2,4 : 1. Kebanyakan kanker hati merupakan kanker hati primer yaitu sekitar 70%–85% (Ahmed F, 2008). Kanker hati merupakan penyebab kedua kematian karena kanker di dunia, sesuai dengan estimasi 746,000 kematian dan 782,000 kasus baru di tahun 2012 (Globocan 2012).

Terapi yang dilakukan pada kanker hati disesuaikan dengan *staging* tumor. Transplantasi hati, terapi *percutaneous ablation* dilakukan pada pasien dengan stadium awal, dan untuk pasien stadium intermedia digunakan *TACE (Transarterial chemo embolization)*. Dan pemberian sorafenib untuk pasien dengan stadium lanjut (Yang dan Roberts, 2010).

Salah satu bahan alam yang potensial dikembangkan sebagai agen ko-kemoterapi adalah *propolis*. *Propolis* merupakan suplemen nutrisi yang dihasilkan oleh lebah dan telah digunakan sebagai pengobatan tradisional di dunia. Senyawa fenolik pada *propolis* memiliki aktivitas kemoprotektif di sel-sel kanker karena kemampuan *propolis* menangkap radikal bebas (Kampa, 2007). Selain itu, *propolis* juga telah digunakan secara aman oleh dokter di Brazil, Jepang dan beberapa negara lain sebagai nutrisi suportif yang menyertai terapi standar untuk kanker (Paulino, *et al* 2009). *Propolis* terdiri dari campuran *resin*, serbuk sari dan lilin tanaman yang

dikumpulkan lebah dari berbagai jenis tanaman dan digunakan untuk proteksi sarang lebah dari mikroba (Ananda, 2013 ; Watanabe, 2011). Komposisi *propolis* sangat kompleks yaitu : terutama lilin tanaman, *resin* dan *volatile*. Kelompok kimiawi utama di *propolis* adalah *resin* yang meliputi asam fenolik, dan esternya, *flavonoid* (*flavon*, *flavanon*, *flavonol*, *dihydroflavonols* dan *chalcones*), *aldehid aromatic* dan alkohol, asam lemak, *stilbenes* dan *b-steroids* (Marcucci, 1995; Gardana, 2007). Komposisi senyawa kimiawi dan aktivitas biologi *propolis* bervariasi tergantung lokasi geografi, asal tanaman, musim dan spesies lebah (Paulino, 2009). *Propolis* telah dibuktikan mempunyai berbagai aktivitas biologis seperti antibakteri, antijamur, antivirus, anestetik lokal, antiinflamasi, antioksidan, hepatoprotektor, imunostimulator, antikanker (antiproliferatif dan *proapoptosis*) serta berperan pada proses penyembuhan luka (Paulino, 2009 ; Vatansever, 2010 ; Kubina, 2015).

Propolis memodulasi target sel pada sel kanker yang berbeda seperti *nuclear transcription factor (NFκB)*; jalur translasional pada *Ras-GTPase* g; jalur *p38-MAPK*, jalur *PI3K/Akt/PKB*; jalur *COX-2* dan prostaglandin E_2 ; dan ekspresi *iNOS* atau *e-NOS* dan produksi nitrit oksida. Juga memodulasi fragmentasi *DNA* yang diinduksi jalur *cytochrome-C* ; protein *p53*; pelepasan protein *proapoptosis* Bax dan Bak ; inhibisi *neoangiogenesis* dengan modulasi pada ekspresi *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF), mengatur diferensiasi sel melalui protein *p21 (Waf1/Cip1)* yang berhubungan dengan CDK2 dan *cyclin E*. Oleh karena itu *propolis* digunakan untuk meningkatkan efikasi obat kemoterapi (Paulino, 2009).

Aktivitas antikanker *propolis* ini dipengaruhi oleh geografis dan tumbuhan sebagai asal pengumpulan resin oleh lebah untuk membentuk *propolis*. Dua faktor tersebut mempengaruhi komposisi dari *propolis* (Syamsudin, 2009).

Berdasarkan fakta-fakta yang diuraikan di atas, mendorong peneliti untuk mengetahui pengaruh pemberian *propolis* yang berasal dari Kerjo, Karanganyar, Indonesia terhadap peningkatan ekspresi *p21* dan induksi *apoptosis*, terutama terkait dengan peningkatan ekspresi protein *Bcl2* dan *p21* pada kultur sel *Hep G2* (*cell line* kanker hepar). Penelitian ini sebagai upaya penemuan dan pengembangan strategi baru dalam melawan kanker, khususnya kanker hepar dengan memanfaatkan kekayaan sumber daya hayati lokal.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak ethanol *propolis* mampu menurunkan ekspresi *Bcl2* pada kultur sel kanker hepatoseluler (*Hep G2*)?
2. Apakah ekstrak ethanol *propolis* mampu meningkatkan ekspresi *p21* pada kultur sel kanker hepatoseluler (*Hep G2*)?
3. Apakah ekstrak ethanol *propolis* mampu meningkatkan ekspresi *Bax* pada kultur sel kanker hepatoseluler (*Hep G2*)?
4. Apakah ekstrak ethanol *propolis* mampu menginduksi *Apoptosis* pada kultur sel kanker hepatoseluler (*Hep G2*)?
5. Apakah ekstrak *propolis* mampu menekan proses proliferasi kultur sel *Hep G2*.

C. Tujuan Penelitian

1. Mengkaji potensi antikanker ekstrak *propolis* pada kultur sel *Hep G2* terkait perannya dalam menghambat proliferasi sel dan induksi *apoptosis*.
2. Mengkaji kemampuan ekstrak *propolis* dalam menekan ekspresi *Bcl2* pada kultur sel *Hep G2*.
3. Mengkaji kemampuan ekstrak *propolis* dalam meningkatkan ekspresi protein *Bax* pada kultur sel *Hep G2*.
4. Mengkaji kemampuan ekstrak *propolis* dalam meningkatkan ekspresi protein *p21* pada kultur sel *Hep G2*.
5. Mengkaji kemampuan ekstrak *propolis* dalam menekan proses proliferasi kultur sel *Hep G2*.

D. Manfaat Penelitian

1. Aspek teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait aktivitas antikanker ekstrak *propolis* dan mekanisme molekulernya terkait hambatan proliferasi sel dan induksi *apoptosis* pada sel *Hep G2*.

2. Aspek praktis

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian lanjutan dalam rangka pengembangan ekstrak *propolis* sebagai strategi terapi *adjuvant* yang baru untuk kanker, khususnya kanker hati.

BAB II

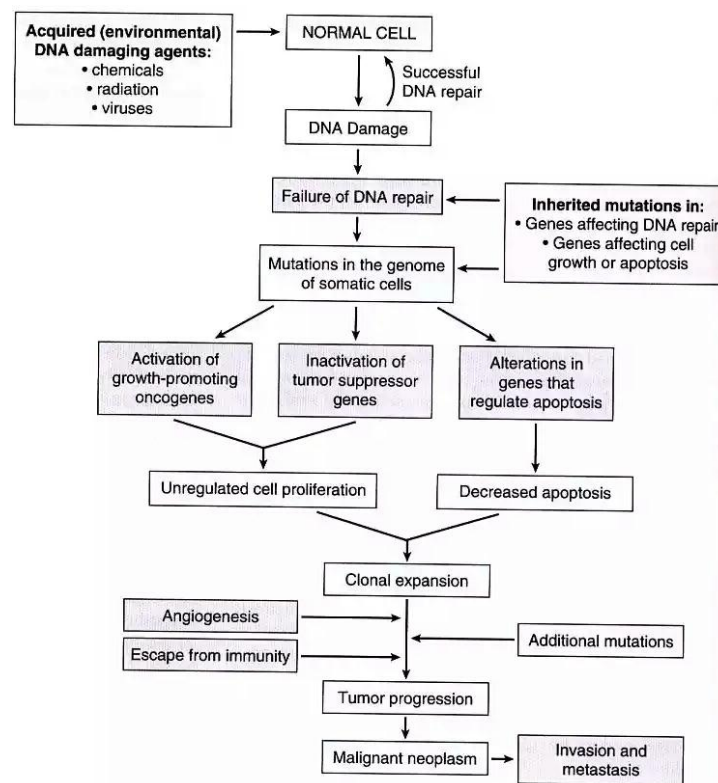
TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Kanker

Menurut *American Cancer Society* (2009) kanker adalah suatu istilah untuk penyakit yang melibatkan pembelahan sel secara *abnormal*, tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan di sekitarnya. Dasar karsinogenesis adalah adanya kerusakan genetik *nonlethal* pada sel. Kerusakan genetik ini dapat karena pengaruh lingkungan atau *herediter* (Kumar, 2005). Sistem kontrol yang secara normal mencegah pertumbuhan sel yang berlebihan dan invasi sel ke jaringan yang lain telah mengalami perubahan pada sel kanker (*Cell Biology and Cancer*, 2008). Penyakit kanker adalah suatu kondisi sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali (Diananda, 2009).

Pertumbuhan kanker merupakan proses *microevolutioner* yang dapat berlangsung dalam beberapa bulan atau beberapa tahun (Albert, 1994). Proses pertumbuhan ini dinamakan karsinogenesis, dimulai dari satu sel kanker yang memperbanyak diri dan membentuk koloni kecil dalam jaringan yang sama. Selanjutnya terjadi perubahan genetik (seperti aktivasi *oncogen*) yang menyebabkan koloni dari sel *abnormal* ini menjadi *malignant* (Scheneider, 1997). Adanya disregulasi pada gen kanker ikut berperan dalam perkembangan kanker. Biasanya gen penyebab kanker dijelaskan berdasarkan perkiraan fungsinya. *Patogenesis* kanker dapat dilihat pada gambar. 1.



Gambar. 2.1 : Skema dasar molekuler kanker (Kumar, 2005)

Mutasi pada gen yang mengendalikan sifat-sifat tersebut ditemukan pada semua kanker. Telah dipahami sebelumnya bahwa terjadinya mutasi pada gen penyebab kanker ditentukan oleh peran gen-gen yang terkait dengan proses perbaikan *DNA* yang dimiliki sel. Apabila gen yang secara normal berfungsi mendeteksi dan memperbaiki kerusakan *DNA* ini terganggu, mengakibatkan terjadinya *instabilitas genom* sehingga cenderung memudahkan terjadinya keganasan (Kumar, 2005).

Gen-gen yang mengalami malfungsi dan terlibat dengan kanker ini diklasifikasikan ke dalam 3 kelompok. Pertama, *proto-onkogen* yaitu gen yang mengkode protein yang secara normal memicu pembelahan sel dan menghambat

kematian sel yang terprogram (*apoptosis*). Mutasi pada gen-gen ini disebut sebagai *onkogen*. Kelompok kedua adalah *tumor suppressor genes* yang mengkode protein yang secara normal menghambat pembelahan sel dan memicu apoptosis. Kelompok ketiga merupakan gen-gen yang berperan pada proses *DNA repair* yang akan meminimalisasi mutasi-mutasi yang bisa berakibat sebagai kanker (*Cell Biology and Cancer*, 2008).

Perlindungan utama dalam perkembangan kanker pada manusia, diperantarai oleh dua jalur utama yang melibatkan protein *retinoblastoma (RB)* dan protein *p53*. Pada kanker, dua jalur tersebut lebih sering berada dalam kondisi terinaktivasi. Jalur *RB* melibatkan protein *cyclin D*, *CDK4*, *p16^{INK4A}* dan *RB*. Jalur ini merupakan faktor penting dalam transisi fase G1/S pada siklus sel. Jalur kedua adalah protein *p53* yang merupakan protein penekan tumor. Protein ini berfungsi sebagai pertahanan alami terhadap kanker (Pelengaris dan Khan, 2006). Protein *p53* bekerja dengan cara menghentikan siklus sel untuk memperbaiki kerusakan *DNA* dan akan menginduksi proses *apoptosis* jika perbaikan *DNA* yang rusak tersebut mengalami kegagalan (Mc.Donald dan Pilgram, 1999). Mutasi pada gen yang mengkode *p53* merupakan mutasi penyebab kanker yang tersering pada manusia (Sherr, 1996). *p21* menghambat aktivitas *cyclindependent kinase* yang dibutuhkan dalam tahap G1 (*Cell Biologyand Cancer*, 2008).

2. Kanker Hati

Kanker hati adalah kanker yang berasal dari sel hepatosit dan bisa merupakan kanker primer dan sekunder. Tumor primer di hati sebesar 90 % adalah

karsinoma hepatoseluler (Turobova T, 2014).

a. Epidemiologi

Distribusi penderita kanker hati di dunia sangat beragam, dengan perkiraan jumlah kasus baru 350.000 dan dua pertiganya di diagnosis di kawasan Timur , ratusan kasus baru di Amerika Serikat dan hanya sekitar 30.000 kasus baru di diagnosis di benua Eropa tiap tahunnya.

Tingkat kejadian *Hepato Cell Carcinoma (HCC)* meningkat 2 kali lipat di Amerika Serikat pada periode 1985-2002, dan usia penderita yang makin muda (dengan pergeseran ke arah berusia 45-60 tahun). Kanker hati telah menjadi penyebab yang paling cepat berkembang dari kematian pada pria dengan kanker (El-Seragh, 2004). Di Amerika Serikat 15-50% pasien *HCC* telah diketahui faktor risikonya, seperti infeksi *virus hepatitis*, konsumsi alkohol berat atau paparan *aflatoksin B1* (El-Seragh, 2007). Selain itu, sekitar 10% dari semua kasus kanker hati di USA terjadi pada pasien dengan hati *non-sirosis* (Shaw & Shah, 2011).

Di Indonesia, menurut data dari Rumah Sakit Kanker Dharmais, pada tahun 2010 karsinoma hati (hepatoma) tetap masuk dalam 10 besar kanker tersering.



Gambar. 2.2 : 10 Besar Kanker Tersering di RSKD (Kasus Baru) Tahun 2010

(Sumber: Bidang Rekam Medik RSKD).

b. Etiologi

Secara umum kanker selalu dihubungkan dengan : bahan-bahan kimia, bahan-bahan radioaktif, dan virus. Umumnya kanker usus besar terjadi dihubungkan dengan faktor genetik dan lingkungan. Serta dihubungkan juga dengan faktor predisposisi diet rendah serat, kenaikan berat badan, dan intake alkohol (Dorundi, 2006).

Faktor Risiko Kanker Hati

1. *Hepatitis B*

Sebagian besar atau hampir setengah lebih penderita *hepatoma* di dunia karena *hepatitis B*. Sebuah penelitian di Taiwan yang disosialisasikan tahun 2010 menunjukkan bahwa *carrier HBV* (individu asimtomatik) dengan tes fungsi hati normal, replikasi *HBV* normal dan virus tidak dideteksi di dalam

darah, memiliki risiko 4 x lebih mungkin terjadi *hepatoma* dibandingkan dengan individu normal (Chen JD, 2010). Risiko dan penampakan *Hepatoma* (*HCC*) pada karier *Hepatitis B* tergantung etnis. Karier *Hepatitis B* golongan kulit putih, cenderung terkena *hepatoma* saat usia tua setelah mengalami *sirosis hepatis* yang lama, dimana warga Asia dan Afrika cenderung terkena *hepatoma* di usia yang lebih muda dan usia pertengahan dan lebih sedikit mengalami *sirosis hepatis* terlebih dahulu. Variasi genetik diduga juga menyebabkan perbedaan diantara etnik etnik tersebut. Penularan *Hepatitis B* di wilayah dunia bagian barat biasanya pada dewasa dengan cara : penggunaan obat – obat suntikan, hubungan seksual, tranfusi darah, transplantasi organ, *hemodialisis*. Di wilayah Afrika dan Asia biasanya terpapar dari ibu ke bayinya (Yang dan Roberts, 2010).

2. *Hepatitis C*

Hepatitis C merupakan penyebab *sirosis hepatis* dan kanker hati terbanyak di Eropa termasuk di Amerika. *Hepatitis C* biasanya ditularkan dengan transmisi langsung lewat darah penderita, baik melalui obat *intravena* dan hubungan seksual. Melalui alat alat medis serta jarum yang terkontaminasi *Hepatitis C* juga bisa. Pada studi populasi di Taiwan, penduduk yang diikuti selama penelitian 9,2 tahun, individu dengan antibodi anti *HCV* seropositif memiliki risiko 20 kali lipat risiko *hepatoma* dibandingkan dengan individu dengan anti *HCV* negative (Sun CA, 2003)

3. *NASH*

Penyakit hati alkoholik merupakan penyebab tersering dari *hepatoma* setelah

kejadian *hepatoma* karena *hepatitis C*. Wanita dengan alkohol memiliki faktor risiko lebih berat terkena *hepatoma* dibandingkan dengan laki –laki. *NASH* merupakan faktor risiko baru terjadinya *hepatoma*. Faktor risiko terjadinya *NASH* adalah obesitas. Saat ini sebagian besar penduduk terkena obesitas. *NASH* berperan dalam peningkatan angka kejadian *hepatoma*, namun saat ini data yang mendukung masih sedikit (Yang dan Roberts, 2010).

4. *Aflatoxin B*

Adalah mikotoksin yang berperan sinergistik dengan *Hepatitis B* dalam *patogenesis hepatoma*. *Aflatoxin* menyebabkan mutasi *DNA*, khususnya gen *TP53*, yang memperkuat fungsi *tumor suppressor* dari *p53*. Mikotoksin ini biasanya ada di makanan yang kurang bersih, di daerah dengan sumber daya kesehatan yang masih minimal yaitu di daerah sub-Saharan Afrika dan Asia Tenggara (Qian G, 1994).

c. *Diagnosis dan Staging*

Diagnosis karsinoma hepatoseluler atau *hepatoma* menggunakan pemeriksaan fisik, laboratorium dan penunjang lain seperti *USG*, *CT- scan* dan biopsi hepar.

Sistem *staging* yang digunakan sesuai dengan *BCLC* (*Barcelona Clinic Liver Cancer*)

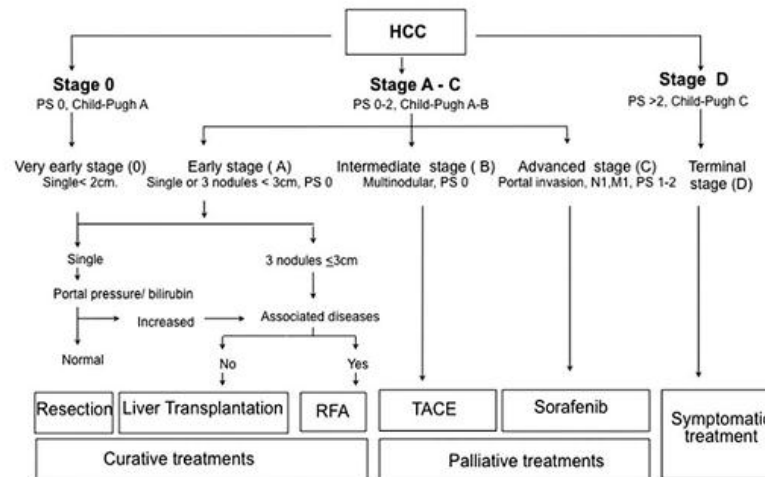


Fig. 2. The BCLC staging system for HCC. M, metastasis classification; N, node classification; PS, performance status; RFA, radiofrequency ablation; TACE, transarterial chemoembolization.

Gambar.2.3 : Algoritma BCLC staging

Sesuai dengan pedoman dari *American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)*, lesi baru di hepar ukuran diameter >1 cm yang menunjukkan *arterial enhancement* yang diperiksa dengan *CT-scan* dinamik pada pasien sirosis terdiagnosa sebagai *hepatoma*. Lesi dengan diameter <1 cm harus dimonitor dengan *USG* dalam interval 3–6 bulan. Jika tidak ada perubahan ukuran dalam 2 tahun, pasien di monitor per 6 bulan (Bruix J, Sherman M, 2005).

d. Terapi

Terapi untuk pasien karsinoma hepatoseluler berdasarkan *BCLC* adalah : Tindakan kuratif (reseksi, transplantasi hepar, tindakan *percutaneous ablation*) dilakukan pada pasien yang *asimptomatic* dan stadium awal. *TACE* diindikasikan untuk pasien yang *asimptomatic*, *multinodular HCC* (*intermediate*, stadium B), Kemoterapi sorafenib untuk pasien stadium lanjut

(*stage C*) . Terapi suportif untuk pasien stadium terminal (*stage D*) *HCC* (Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J, 2010).

3. Sel Kultur *Hep G2*

Hep G2 (ATCC® HB-8065™) adalah sel kultur karsinoma hepatoseluler dari seorang pria Kaukasia usia 15 tahun jenis *well differentiated*. Medium dasar untuk *cell line* ini ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Katalog No. 30-2003. Untuk membuat media pertumbuhan lengkap, ditambahkan *fetal bovine serum* untuk konsentrasi akhir 10% (Knowless BB dan Aden DP, 1983).

Sel *HepG2* awalnya melekat di bagian kecil sel dalam berbagai kelompok berbentuk suspensi. Setelah beberapa hari, pertumbuhan akan tampak dari koloni sel. Terkadang sel akan menumpuk pada koloni sel sehingga tampak berlapis-lapis, ini merupakan morfologi yang tidak biasa untuk *cell line* ini. Dalam minggu pertama pemulihan dari *cryopreservation*, ada sel-sel mengambang yang tampak pada kultur. Sel yang mengambang ini jangan dibuang, dapat dipertahankan dengan sentrifugasi 125x, lalu dikembalikan ke populasi awal, ketika makan dengan media segar setiap 2 atau 3 hari. Memisahkan atau membuang sel-sel. mengambang layak dapat membuat budaya terlalu encer dan pertumbuhan akan *lag* (atau berhenti).

4. Siklus Sel

Sel memperbanyak diri melalui suatu peristiwa berurutan yang terdiri dari proses duplikasi kromosom dan dilanjutkan dengan proses pembelahan sel. Suatu siklus yang terdiri dari duplikasi dan pembelahan sel ini dikenal dengan siklus sel (Alberts, 2008). Siklus sel terbagi atas empat fase, yaitu fase gap G1, fase S (fase sintesis *DNA*), fase gap G2 dan fase M (fase pembelahan inti dan sel). Selain empat

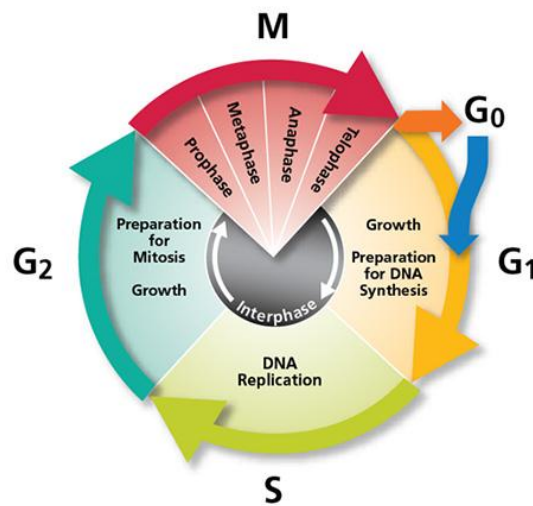
fase tersebut, terdapat sebuah fase lain yaitu fase G₀. Pada fase ini sel berada pada kondisi istirahat dan tidak melakukan pembelahan. Sel pada fase G₀ dapat beristirahat dalam waktu yang cukup lama bahkan permanen (Pelengaris dan Khan, 2006).

Fungsi mendasar dari siklus sel adalah untuk menduplikasi dengan akurat keseluruhan DNA pada kromosom sel induk kemudian membagikan salinan tersebut secara tepat kepada dua sel anakan sehingga genetiknya identik dengan sel induk, dimana tiap-tiap sel anakan tersebut mendapatkan salinan dari keseluruhan genom induk. Proses duplikasi kromosom terjadi selama fase S (*sintesis DNA*) kemudian dilanjutkan dengan proses pembagian kromosom dan pembelahan sel yang terjadi pada fase M (*mitosis*) (Alberts, 2008).

Fase gap memberi waktu kepada sel untuk tumbuh sekaligus memonitor kondisi lingkungan internal dan eksternal untuk memastikan kondisi tersebut cocok dan persiapan telah lengkap sebelum sel berkomitmen untuk memasuki fase S maupun M. Jika kondisi lingkungan eksternal menguntungkan dan terdapat sinyal pertumbuhan, sel dari fase G₁ atau G₀ akan bergerak menuju *start/restriction point*. Setelah melewati titik ini, sel berkomitmen untuk melakukan replikasi DNA dan proses tersebut akan tetap berlangsung meskipun sinyal ekstraseluler yang menstimulasi pertumbuhan tersebut dihilangkan (Alberts, 2008).

Supaya siklus sel berjalan secara benar dan terkendali maka terdapat dua macam mekanisme kontrol siklus sel yang menyertainya. Pertama, suatu jalur atau *cascade* fosforilasi protein yang memungkinkan sel berjalan dari satu tahap ke tahap berikutnya. Jalur ini melibatkan *famili kinase* yang diregulasi dengan ketat

(Collins, 1997). Menurut Pelengaris dan Khan (2006) setiap fase dari siklus sel dipengaruhi oleh aktivasi *cyclin-dependent kinase* (CDK) yang terkait dengan protein regulator subunitnya, yaitu *Cyclin*. Ikatan antara kedua jenis protein ini menentukan kelangsungan dari siklus sel. Mekanisme kontrol siklus sel yang kedua adalah satu set *checkpoints* yang memonitor kelengkapan dari peristiwa kritis pada siklus sel seperti replikasi *DNA* dan segregasi kromosom. Jika *checkpoints* ini diaktivasi oleh adanya replikasi yang belum tepat ataupun kerusakan *DNA*, maka kemajuan siklus sel ke tahap berikutnya akan mengalami penundaan (Collins, 1997). Untuk memberi gambaran fase-fase yang terdapat pada siklus sel dan *checkpoints* yang menyertainya, dapat dilihat pada gambar. 4.



Gambar.2. 4 : Siklus Sel (*Cell Biology and Cancer*, 2008)

Menurut Kumar (2005) terdapat beberapa jenis *cyclin*, yaitu *cyclin* A, B, C, D, E yang masing-masing akan diekspresikan secara periodik pada tahap tertentu dari siklus sel. *Cyclin* D memiliki peran sentral karena ekspresinya diregulasi oleh faktor pertumbuhan dan kompleks *cyclin D-CDK4* ini akan memfosforilasi protein

retinoblastoma (pRB). Fosforilasi *pRB* mengakibatkan lepasnya faktor transkripsi *E2F* yang akan memediasi transkripsi dari beberapa gen yang mengkode protein-protein yang menentukan kelangsungan dari siklus sel. Hal ini menunjukkan bahwa *cyclin D* merupakan *starter* dari siklus sel (Alison, 2001).

Berhentinya siklus sel dapat terjadi karena adanya *CDK inhibitor (CDKI)*, diantaranya *famili INK4 (inhibitor of CDK4)*. Protein *INK4* khususnya *p16^{INK4}* akan berkompetisi dengan *cyclin D* untuk berikatan dengan *CDK4/6* sehingga akan mencegah fosforilasi *pRB*. Jalur *Rb-cyclin D-CDK4-p16* merupakan jalur utama yang mengontrol pertumbuhan sel. Di samping itu, faktor transkripsi *p53* juga dapat berperan dalam berhentinya siklus sel. Peningkatan ekspresi *p53* dipicu oleh berbagai stres seluler yang selanjutnya akan menginduksi ekspresi *p21^{cip7}* yang merupakan inaktivator yang kuat terhadap kompleks *cyclin-CDK* (Alison, 2001).

5. Apoptosis

Kematian sel dapat terjadi minimal melalui dua mekanisme, yaitu nekrosis maupun *apoptosis*. Nekrosis merupakan proses kematian sel patologis yang terjadi secara pasif, katabolik dan umumnya merupakan respon terhadap faktor-faktor toksik eksternal, seperti inflamasi, iskemia maupun *toxic injury*. Nekrosis ditandai dengan adanya pembengkakan mitokondria, ruptur membran plasma, pemisahan kromatin dan destruksi struktur sel yang semula utuh (Wu, 2001). Menurut Kumar (2005), pada proses nekrosis terjadi pelepasan komponen sitoplasma sehingga mencetuskan respon inflamasi.

Berbeda dengan nekrosis, *apoptosis* merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram dan terjadi secara aktif, metabolik serta dikode secara genetik.

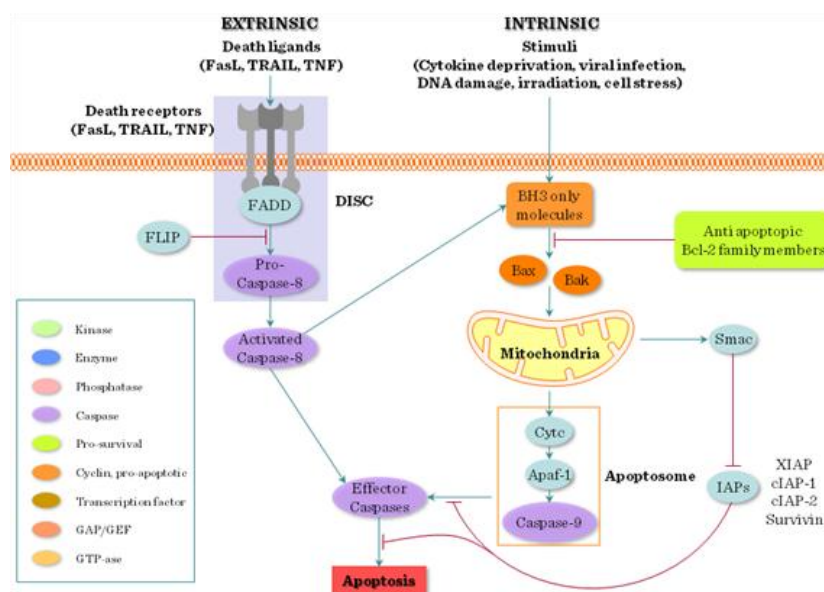
Apoptosis ditandai dengan adanya *membran blebbing*, kondensasi kromatin, dan aktivasi proses endonukleotik yang menyebabkan fragmentasi *DNA* sehingga sel mengecil dan terbentuk *apoptotic bodies* (Wu, 2001). Pollard dan Earnshaw (2008) menyatakan bahwa di jaringan, *apoptotic bodies* ini akan difagositosis oleh sel-sel di sekelilingnya yang mengenali *phosphatidylserine* dan penanda lain yang terdapat di permukaannya. Proses eliminasi sel-sel yang mengalami *apoptosis* ini tanpa disertai kebocoran komponen sitoplasma ke dalam celah interseluler sehingga meminimalisasi inflamasi, mencegah kerusakan sel-sel yang berdekatan dan secara efisien mendegradasi *DNA* (Wu, 2001).

Apoptosis terjadi selama perkembangan yang normal dari organisme multiseluler. Kombinasi dari *apoptosis* dan proliferasi sel bertanggung jawab pada proses pembentukan jaringan dan organ pada *embrio* yang sedang berkembang (Dash, 2003). *Apoptosis* merupakan mekanisme untuk mengontrol proliferasi sel sebagai bagian dari proses perkembangan yang normal dan juga akan mengakibatkan kematian sel jika terdapat kerusakan *DNA* yang tidak dapat diperbaiki (Ghobrial, 2005).

Mekanisme *apoptosis* terjadi melalui dua jalur utama. Pertama, jalur ekstrinsik atau jalur sitoplasma yang dipicu oleh ikatan antara *Fas death receptor* dengan *Fas ligand (FasL)* maupun ikatan antara *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 (TNFR1)* dengan ligannya yaitu *TNF*. *Death receptor* ini memiliki *death domain* intraseluler yang akan merekrut protein-protein adaptor seperti *TNF receptor-associated death domain (TRADD)* dan *Fas-associated death domain (FADD)* sehingga akan terbentuk kompleks antara ligan-reseptor-protein adaptor

yang dikenal dengan *death-inducing signalling complex (DISC)*. Selanjutnya *DISC* akan mengaktivasi pro-caspase 8 menjadi caspase 8 yang merupakan *caspase inisiator*. Caspase 8 ini akan menginisiasi proses *apoptosis* dengan memecah caspase esksekutor yang berada di bawahnya (Wong, 2011).

Jalur kedua adalah jalur intrinsik atau jalur mitokondria. Jalur ini dipicu oleh adanya stimulus internal seperti kerusakan genetik yang tidak dapat diperbaiki, hipoksia, konsentrasi Ca^{2+} di sitosol yang sangat tinggi dan stres oksidatif yang berat. Stimulus internal ini akan meningkatkan permeabilitas mitokondria dan menyebabkan pengeluaran molekul-molekul *pro-apoptosis* seperti *cytochrome-c* ke dalam sitoplasma. Pengeluaran *cytochrome-c* ini akan memicu pembentukan suatu kompleks yang dikenal sebagai *apoptosom* yang merupakan gabungan dari *cytochrome-c*, *Apaf-1* dan *caspase 9* (Wong, 2011). Selanjutnya, pembentukan *apoptosom* ini akan mengaktivasi *caspase 9* dan menginduksi terjadinya *apoptosis* (Dash, 2003).



Gambar. 2.5 : Apoptosis jalur ekstrinsik dan instrinsik (Berki, 2011).

Apoptosis jalur intrinsik diregulasi oleh sekelompok protein yang termasuk ke dalam famili protein *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)*. Terdapat dua kelompok utama dari protein *Bcl-2*, yaitu kelompok protein *pro-apoptosis* seperti *Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim*, dan *Hrk*. Kelompok kedua yaitu kelompok protein anti-*apoptosis* seperti *Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1* dan *Mcl-1* (Wong, 2011). Sensitivitas sel terhadap stimulus *apoptosis* tergantung pada keseimbangan antara protein *pro-apoptosis* dan anti-*apoptosis*. Peningkatan protein *pro-apoptosis* mengakibatkan sel lebih sensitif terhadap apoptosis karena dengan adanya peningkatan protein ini pada permukaan mitokondria, akan memicu terbentuknya *Permeability Transitionpore (PT pore)* yang diikuti dengan pengeluaran *cytochrome-c*, sedangkan peningkatan protein anti-*apoptosis* mengakibatkan sel resisten terhadap *apoptosis* (Dash, 2003)

Berkurangnya proses *apoptosis* maupun resistensi sel berperan penting pada proses karsinogenesis. Pengurangan proses *apoptosis* maupun resistensi *apoptosis* pada sel ganas bisa terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu gangguan keseimbangan antara protein *pro-apoptosis* dan anti-*apoptosis*, penurunan fungsi *caspase* dan kegagalan proses *death receptor signalling* (Wong, 2011).

Terdapat beberapa metode untuk menguji apakah suatu senyawa dapat menginduksi *apoptosis in vitro*. Salah satu metode yang obyektif adalah dengan pemberian *annexin V*. *Annexin V* dapat berikatan secara kuat dan spesifik dengan *phosphatidylserine (PS)* dan dapat digunakan untuk mendeteksi *apoptosis*. Metode ini didasarkan pada pengikatan *annexin V* yang mengandung ion Ca^{2+} pada *phospholipids* yang memiliki muatan negatif seperti *phosphatidylserine*. Pada sel

yang hidup, *PS* secara predominan berlokasi pada permukaan membran yang berhadapan dengan sitosol. Dengan adanya *apoptosis*, *asimetri* pada membran plasma akan hilang dan mengakibatkan adanya *PS* pada permukaan luar membran. Hal ini menyebabkan *annexin V* bisa berikatan dengan permukaan luar dari sel yang mengalami *apoptosis* (Van Engeland, 1998; Eray, 2001)

Annexin V tidak dapat berikatan dengan sel hidup yang normal karena molekulnya tidak dapat menembus membran *phospholipid bilayer*. Namun *annexin V* dapat berikatan dengan permukaan dalam dari membran plasma yang telah kehilangan integritasnya selama tahap akhir *apoptosis*, maupun juga pada proses nekrosis (Eray, 2001). Untuk membedakan antara sel yang hidup, *apoptosis* dan nekrosis, ditambahkan pengecatan *DNA* yang *impermeable* terhadap membran, seperti *propidium iodida (PI)* ke dalam suspensi sel. Berdasarkan hal ini, sel yang hidup, *apoptosis* dan nekrosis dapat dibedakan dengan pengecatan ganda *annexin V* dan *PI* serta dianalisis menggunakan *flowcytometry* maupun mikroskop fluoresen. Sel yang hidup memberikan gambaran yang negatif terhadap *annexin V* dan *PI*, sel *apoptosis* tampak dengan *annexin V* positif dan *PI* negatif, sedangkan sel yang nekrosis memberikan gambaran positif terhadap *annexin V* dan *PI* (van Engeland, 1998; Eray, 2001).

6. Protein *p21*

p21 adalah suatu *tumor suppressor protein* dengan berat 21 KDa memiliki fungsi utama dalam regulasi terhadap progresi siklus sel. Hasil ini terutama dicapai dengan menghalangi ikatan *CDK* dengan *cyclin*. Pada awalnya protein ini dikenali menghalangi ikatan antara *CDK2* dengan *cyclin E* seiring dengan waktu, *p21* juga

mampu berikatan dengan *CDK2*, *CDK3*, *CDK4* dan *CDK6*. Ikatan *CDK* dan *p21* diperkuat oleh *cyclin* yang bersesuaian dengan *CDK* tersebut. Preferensi dari *p21* untuk berikatan dengan *CDK* yang berhubungan dengan fase transisi G1/S membuatnya memiliki peranan penting sebagai suatu *check point* kemajuan siklus sel untuk mencegah replikasi dan penurunan *DNA* yang rusak (Alisson, 2001).

7. Protein *Bcl2*

Sebagai suatu *oncogen*, pada awalnya gen *Bcl2* ditemukan memiliki kemampuan minimal untuk meningkatkan progresi siklus sel maupun proliferasi sel. Namun terjadinya overekspresi dari *Bcl2* secara spesifik mencegah sel untuk mengalami *apoptosis* dalam responnya terhadap sejumlah rangsangan sehingga memeperpanjang kelangsungan hidup sel. Overekspresi *Bcl2* pada sel limfoma merupakan proses onkogenik primer yang bertanggungjawab menyebabkan sel menjadi resisten terhadap *apoptosis*. Namun demikian, ekspresi *Bcl2* juga kemudian ditemukan pada sel-sel *limfoid* yang normal dan juga pada kelainan limfoproliferatif tanpa adanya translokasi kromosom 14 dan 18 (Naim, 2006; Muris, 2006; Walensky, 2008). Gen *Bcl2* berlokasi di kromosom 18q21, dengan rentang lebih dari 230 kb *DNA* dan terdiri dari 3 *exon*, dengan *exon 2* serta sebagian kecil *exon 3* merupakan pengkode protein. *Bcl2* mengkode 2 *mRNA*, yaitu *Bcl2 α* dan *Bcl2 β* , dimana hanya *BCL2 α* yang memiliki relevansi biologis. Protein *Bcl2* merupakan protein membran dengan berat molekul 26-kDa, mempunyai rantai *asam amino* hidrofobik, yang diperlukan untuk insersi pada membran sel, inti dan mitokondria. Meskipun translokasi gen merupakan mekanisme utama untuk

aktivasi gen *Bcl2*, namun telah dilaporkan pula terjadinya proses mutasi dan amplifikasi (Bronchud, 2004).

Secara ultrastruktural, protein *Bcl2* pertama kali ditemukan pada membran dalam mitokondria. Pemeriksaan mikroskop elektron kemudian membuktikan bahwa imunoreaktivitas *Bcl2* berlokasi pada membran luar mitokondria, membran nukleus, juga pada membran sel dalam jumlah yang lebih minimal. Lokasinya pada mitokondria mengindikasikan fungsi fisiologis *Bcl2* yang dimediasi oleh fungsi metabolik dari organel sel ini (Rautureau, 2010).

Protein ini mengatur kematian sel dengan mempengaruhi permeabilitas membran mitokondria, melalui keterlibatannya dalam mekanisme umpan balik *caspase*. Protein *Bcl2* menghambat kerja *caspase* dengan mencegah pelepasan sitokrom c dari mitokondria dan/atau melalui ikatannya dengan faktor aktivasi *apoptosis* (*APAF-1*) (Biroccio, 2000; Anderson, 2009).

Gen *Bcl2* termasuk ke dalam kelompok gen regulator *apoptosis* yang memproduksi protein *agonis* maupun *antagonis apoptosis*. Telah teridentifikasi lebih dari 20 protein anggota keluarga *Bcl2*, termasuk di dalamnya protein yang *antiapoptosis* (*Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, mcl-1, Bcl-G*) dan *proapoptosis* (*Bax, Bcl-xS, Bak, Bad, Bid, Bik, Bim*). Keluarga protein ini telah dibuktikan peranannya dalam mengatur proses *apoptosis* sebagai respon terhadap kemoterapi baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Meskipun beberapa studi menyatakan bahwa *Bcl2* tidak selalu berfungsi sebagai penghambat *apoptosis*, namun overekspresi gen ini menunjukkan kemampuannya dalam menghentikan atau menunda *apoptosis* dan meningkatkan tingkat *survival* sel tumor setelah pemberian berbagai *stimulus*, termasuk dalam hal

ini pemberian kemoterapi. Penemuan ini memunculkan suatu konsep bahwa peningkatan ambang batas *apoptosis* memiliki peran penting dalam *tumorigenesis* (Biroccio, 2000; Anderson, 2009; Page, 2010).

Saat ini telah dapat diidentifikasi protein homolog dari *Bcl2*, dimana secara struktural ditandai dengan adanya empat domain *Bcl2* *homology* (*BH1, BH2, BH3, BH4*) yang sama-sama memiliki *segmen α -helical*. Kelompok protein antiapoptosis (*Bcl-2, Bcl-xL*) memiliki rangkaian keempat *domain* yang ada, sementara kelompok protein *pro apoptosis* dibagi menjadi kelompok *multi-BH domain* (*Bax, Bak*) yang memiliki *domain BH1, BH2*, dan *BH3*, serta kelompok *BH3-only* (*Bim, Bad*) yang hanya memiliki *domain BH3*. Protein *BH3-only* merupakan struktur yang berperan penting memasangkan dan mengatur interaksi protein-protein ini (Walensky, 2008).

Lokasi *mutagenesis* dari protein *Bcl2*, yaitu *domain BH1* dan *BH2*, menunjukkan bahwa kedua lokasi ini penting untuk pengikatan *Bcl2* dengan *Bax*. Hal ini memberikan kesan bahwa fungsi intrinsik dari *Bcl2* sebagai regulator *apoptosis* yang menghambat maupun mengaktifkan apoptosis terjadi melalui interaksi protein-protein yang saling mempengaruhi satu sama lain (Bronchud, 2004; Page, 2010). Kematian sel ditentukan oleh rasio antara protein-protein yang pro dan anti *apoptosis*, dan ditemukan bahwa efek antiapoptosis dari *Bcl2* dihambat melalui hubungan timbal balik dengan ekspresi protein *Bak* (Park, 2006).

Studi terkini membuktikan bahwa *Bcl2* ditemukan pula pada beberapa jaringan *nonlimfoid*. Introduksi gen yang menghambat fungsi gen *Bcl2* dapat menginduksi *apoptosis* pada sejumlah tipe tumor. Hal ini memunculkan suatu

hipotesis bahwa sel tumor secara kontinyu diatur oleh fungsi produk gen *Bcl2* atau gen lain yang berhubungan untuk mencegah kematian sel. Sesuai dengan hipotesis ini, ekspresi *Bcl2* dihubungkan dengan prognosis yang buruk pada kanker prostat, kanker kolon, dan *neuroblasto*. Hasil yang bertolak belakang didapatkan pada kanker paru dan *mammae*, dimana dengan ekspresi *Bcl2* yang positif pasien memiliki prognosis yang lebih baik (Page, 2010).

8. Propolis

a. Definisi *propolis*

Propolis berasal dari bahasa Yunani yaitu *pro* yang berarti di depan/sebelum dan *polis* yang berarti kota. Istilah ini menggambarkan *propolis* sebagai pelindung sarang lebah dari hal-hal di luar sarang agar supaya sarang dan isinya yang mengandung koloni *larva* lebah madu terlindungi dari bahaya dan senantiasa bersih steril dengan tujuan agar telur dapat menetas dan berkembang dengan sempurna (Hoesada, 2000).

Propolis mempunyai nama lain lem lebah (*bee glue*), hal ini karena bentuknya seperti lem yang digunakan oleh lebah merekat dan memperkuat sarang dan merekat pintu-pintu lubang angin yang tidak diperlukan pada rumah lebah. *Propolis* merupakan bagian dari sebuah mekanisme pertahanan hidup lebah madu. Hal ini diperlukan oleh lebah karena lebah memerlukan tinggal di dalam sarang dengan suhu yang stabil lebih kurang 32-33°C. Fungsi *propolis* yang sangat vital terhadap koloni lebah adalah merupakan *disinfektan* alamiah untuk mencegah timbulnya berbagai penyakit (Dimov, 1992). *Propolis* menjadi bagian dari kehidupan manusia tidak lain karena manfaat khasiat *propolis* untuk pengobatan,

sayangnya seperti halnya obat herbal lainnya, *propolis* masih menjadi rekomendasi pengobatan alternatif, hal ini disebabkan karena :

1. Obat tradisional (obat alami), diambil langsung dari alam yang sangat tergantung pada lingkungan tempat berasal, hal ini akan menyebabkan komposisinya berbeda-beda dan efektivitasnya berubah.
2. Obat tradisional mengandung campuran biokimia kompleks yang bekerja secara sinergis, akibatnya bila zat aktifnya diekstrak, efeknya bisa berkurang atau menghilang hingga sulit diketahui zat aktif mana yang dapat dibuat penelitian.
3. Kaya zat aktif, obat-obatan tradisional juga mampu mengobati berbagai jenis penyakit yang mekanismenya sulit dijelaskan oleh kedokteran *modern*.

Berbagai alasan inilah yang membuat obat tradisional hanya digunakan sebagai pengobatan alternatif dan belum menjadi terapi utama suatu penyakit. Negara-negara seperti Rusia dan Cina masih setia menggunakan *propolis* dan produk alami lain untuk pengobatan. Penelitian farmakologi *propolis* mencakup efek *propolis* sebagai antinyeri (*anestetik*), anti-alergi, antibiotik, antijamur, anti inflamasi, antiradiasi, antioksidan dan pengawet, antiseptik, antikanker dan *immunostimulator* (menstimulasi daya tahan tubuh) (Ang ESM, 2001). Terapi *adjuvant* adalah suatu penambahan pengobatan/*substansi* ke pengobatan utama yang sedang dilakukan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan (Viuda MM, 2008).

b. Kandungan Kimia *Propolis*

Lebah menghasilkan beberapa produk seperti madu, royal jeli, *polen* dan *propolis*. *Propolis* adalah produk alami berasal dari *resin* tanaman yang dikumpulkan oleh lebah madu. *Propolis* digunakan lebah dalam pembuatan, pemeliharaan, perlindungan dan mensterilkan sarang lebah (Marcucci, 2001). Komposisi *propolis* sangat kompleks. Unsur utamanya adalah lilin lebah, *resin* dan senyawa *volatil*. Lebah mensekresikan lilin lebah, sedangkan *resin* dan senyawa *volatil* berasal dari tanaman. Aktivitas biologis *propolis* ditentukan oleh zat tanaman ini berasal. Oleh karena itu, meskipun *propolis* jelas merupakan produk binatang, proporsi yang cukup besar dari komponen-komponennya yang berperan dalam menentukan aktivitas biologis berasal dari tanaman. Faktor-faktor biologik, zona geografis dan lingkungan dapat mempengaruhi jumlah dan kualitas produksi *propolis* (Pereira, 2009).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa komposisi *propolis* dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti sumber bunga (jenis tanaman) untuk madu, musim dan faktor-faktor lingkungan (seperti jenis tanah dan iklim, faktor genetik, dan metode pengolahan). Dengan kata lain, kemungkinan efek-efek yang berhubungan dengan kesehatan sangat tergantung asal-usulnya (Baltrusaityte, 2007).

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan ketinggian wilayah tidak mempengaruhi kandungan *Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)*. Perbedaan jenis tanaman lebih berpengaruh pada kandungan *CAPE*. *Propolis* wilayah Krejo, Karanganyar memiliki kandungan *CAPE* lebih tinggi dibandingkan wilayah Sragen dan Wonogiri. Adanya perbedaan kandungan *CAPE* ini kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan jenis tanaman yang tumbuh di daerah tersebut. *Propolis*

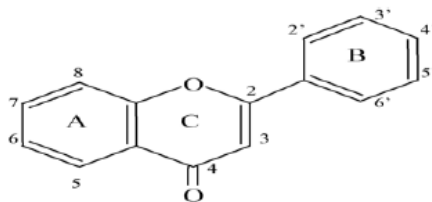
Karanganyar dikumpulkan lebah dari tanaman sekitar yang berupa tanaman durian, matoa, serta rambutan. Untuk wilayah Wonogiri, jenis tanaman utamanya adalah pinus dan randu, sedangkan wilayah Sragen berupa pohon karet (Sarsono, 2012). Selain itu, perbedaan tersebut dimungkinkan karena faktor-faktor biologik, zona geografis dan lingkungan yang dapat mempengaruhi jumlah dan kualitas produksi *propolis* (Pereira, 2009).

Propolis sebagai kompleks *resin* yang dikumpulkan lebah madu dari tunas daun dan kulit pohon sekitarnya untuk kemudian dicampur dengan air liurnya, sehingga menghasilkan produk lebah yang bermanfaat (Marcucci, 2001; Salatino, 2005). Secara penampakan fisik (warna), aroma dan komposisi kimiawi *propolis* terlihat bervariasi tergantung dari berbagai faktor diantaranya zona geografis, karena *propolis*. Warnanya mungkin putih kekuningan (krem), kuning, hijau, coklat terang atau gelap. Beberapa sampel memiliki tekstur, rapuh keras, sedangkan sampel lainnya mungkin elastis dan kenyal (Salatino, 2005). Lebih dari 200 komponen *propolis* telah diidentifikasi. Senyawa yang terkandung dalam *propolis*, secara garis besar dikelompokkan menjadi (i) *flavonoid* (*flavonol*, *flavon*, *flavanon*, dan *dihydroflavonol*), (ii) turunan *cinnamic acid*, dan (iii) *terpenoid*. Turunan *cinnamic acid* (*ferulic acid*, *p-coumaric acid* dan *caffeic acid*, termasuk *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) (Sivasubramaniam L & Seshadri M, 2005; Lotfy M, 2006).

Analisis Fitokimia ekstrak dari 40 senyawa aktif dalam berbagai macam *propolis* berdasarkan wilayahnya menunjukkan adanya komposisi umum seperti

fenol 79,5%, *epigallotannins* atau *tanin* terkondensasi garam 77%, *glikosida* 49%, *saponin* 38%, *flavonoid* 28% dan *alkaloid* 25% (Popova, 2007).

Komponen utama dari *propolis* adalah *flavonoid* dan *asam fenolat*, termasuk *caffeic acid phenylethylester* (CAPE) yang kandungannya mencapai 50% dari seluruh komposisi (Santos, 2005).



Gambar. 2. 6 : Struktur molekul *flavones* (*flavonoid*) (Cushnie, 2005)

Flavonoid terdapat hampir di semua spesies bunga. *Flavonoid* merupakan salah satu golongan *fenol* alam yang terbesar. Golongan *flavonoid* mencakup banyak pigmen yang paling umum dan terdapat pada seluruh dunia tumbuhan. Jenis *flavonoid* yang terpenting dalam *propolis* adalah *pinocembrin* dan *galangin*. Kandungan kimia *flavonoid* dalam *propolis* sedikit berbeda dengan *flavonoid* dari bunga karena adanya suatu proses yang dilakukan oleh lebah. Kandungan *flavonoid* dalam *propolis* bervariasi sekitar 10-20%. Kandungan tersebut merupakan yang terbanyak dibandingkan kandungan *flavonoid* dalam produk lebah lain (Marcucci, 1994). *Galangin* adalah *flavonol* yang umum ditemukan dalam *propolis*.

Tabel 2.1. Senyawa utama dari *propolis* (Marcucci, 1994).

Kelas komponen	Grup komponen
<i>Resin</i> (45-55 %)	<i>flavonoid</i> (<i>flavonoles</i> , <i>flavon</i> , <i>flavonones</i> , <i>ihydroflavonoles</i> , dan <i>chalcones</i>), asam fenolik dan esternya
Lilin dan asam lemak (25-53 %)	kebanyakan berasal dari lilin lebah, tetapi beberapa diantaranya berasal dari tanaman.
Minyak esensial (10 %)	Mudah menguap, senyawa <i>Volatine</i>
Serbuk sari (5 %)	Banyak mengandung <i>asam amino</i> , terutama <i>argini</i> dan <i>prolin</i>
Senyawa organik & mineral lainnya (5 %)	14 mineral, Pada umumnya Fe dan Zn, mineral lainnya adalah Au, Ag, Cs, Hg, La, Sb. <i>Keton</i> , <i>Lakton</i> , <i>Quinon</i> , <i>Steroid</i> , <i>asam benzoic & ester</i> , Vitamin B ₃ , gula

c. Aktivitas biologis *Propolis*

Penggunaan *propolis* sebagai “obat” dimungkinkan karena *propolis* memiliki sejumlah aktivitas biologis antara lain anti *mikrobial*, anti *fungal*, anti *protozoa*, anti *parasit*, antiinflamasi, anti-oksidan, dan *immunomodulator* (Koo,

2002; Ahn , 2004; Lotfy, 2006; El-Bassuony & Abouzid, 2010). Aktivitas biologis *propolis* yang akan penulis bahas adalah aktivitas anti inflamasi, anti oksidan dan *immunomodulator* sesuai dengan titik tangkap *propolis* pada penelitian ini.

1. Aktivitas antikanker

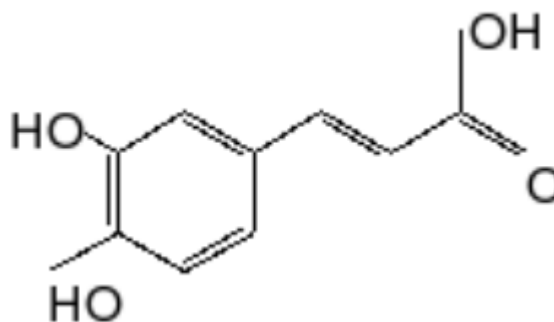
Komponen *polyphenolic* diketahui mempunyai aktivitas antikanker pada tikus model tumor (Orsolic, 2005), dan juga *caffeic acid*, *CAPE*, *quercitin* dapat menghambat pertumbuhan sel kanker (Galati, 2000). *Artepillin C*, yang diisolasi dari *propolis*, dilaporkan mempunyai efek sitotoksik pada karsinoma dan sel *melanoma maligna* melalui mekanisme *apoptosis* dan gangguan pada *mitosis* (Premratanachai P, 2014). Mekanisme utama efek antikanker *propolis* terkait dengan *apoptosis*, penghentian siklus sel, dan juga melalui pengaruhnya pada jalur metabolisme. Terdapat penelitian yang melaporkan bahwa efek penghambatan proliferasi kanker prostat oleh *propolis* dicapai melalui regulasi ekspresi *cyclin D1*, *cyclin B1*, *cyclin dependent kinase*, dan juga ekspresi *p21* (Lie, 2007) Selain itu, efek terapi antikanker pada *propolis* menarik dikarenakan kemampuannya menginduksi *apoptosis*, walaupun mekanisme ini tergantung pada jenis dan konsentrasi dari ekstrak *propolis* (Mouse HA, 2012).

2. Aktivitas antiinflamasi

Extrac etanol propolis (EEP) menunjukkan aktivitas anti-inflamasi baik akut ataupun kronik. *EEP* dosis 50 mg/kgBB/hari/oral dan 100 mg/kgBB/hari per-oral menunjukkan aktivitas anti-inflamasi kronik, sedangkan dosis 200 mg/kgBB/hari per-oral menunjukkan aktivitas anti-inflamasi akut pada hewan coba

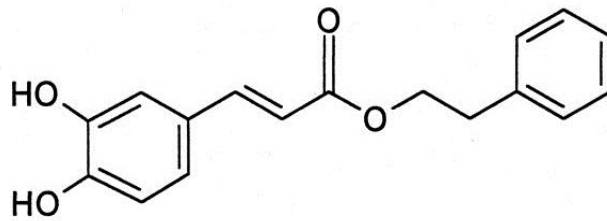
model. Efek antiinflamasi ini ditunjukkan oleh kandungan yang ada di *propolis* lebah yaitu *Caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) (Lotfy, 2006).

Asam Caffeic Phenethyl Ester (CAPE) adalah salah satu senyawa terbesar yang ada dalam *propolis* dan merupakan jenis *asam fenolat*. Sebagai komponen aktif *propolis*, CAPE memiliki kegiatan biologis dan farmakologis termasuk anti-inflamasi, antivirus, antibakteri dan antitumor (Zaeemzadeh, 2011)



Gambar. 2.7 : Struktur molekul asam fenolat (Zaeemzadeh, 2011).

Caffeic acid phenethyl ester merupakan antioksidan fenolik, yang memperlihatkan sejumlah efek farmakologik dan biologik termasuk aktivitas anti-inflamasi, antiviral dan anti-tumor (Orsolic N, 2005). CAPE merupakan penghambat yang poten dan spesifik terhadap aktivasi *NF-κB*. Konsentrasi CAPE dalam *propolis* tergantung pada asal usul geografik dan ekosistem (sumber tanaman), yang akan mempengaruhi aktivitas biologis *propolis* (Fitzpatrick LR, 2001).



Gambar.2. 8 : Struktur Molekul *CAPE* (diambil dari Scapagnini, 2002).

CAPE menunjukkan aktivitas immunosupresif baik pada tahap awal dan lanjut, aktivasi ini dimediasi oleh sel limfosit T. Secara spesifik *CAPE* menghambat transkripsi ataupun sintesis *IL-2*. *CAPE* menghambat aktivitas pengikatan *DNA* dan transkripsi *NF-κB* serta faktor transkripsi *nuclear factor of activated cells (NFAT)*, dan *activator protein-1 (AP-1)*, tanpa mempengaruhi degradasi protein penghambat *NF-κB (I-κB)* yang berada di sitoplasma. Sehingga *propolis* memiliki aktivitas sebagai *immunomodulator* dan anti-inflamasi (Ang ESM, 2009).

3. Antioksidan

Propolis bermanfaat sebagai penetral racun karena berbagai kandungannya dapat membersihkan *polutan* dan racun di dalam tubuh, sehingga metabolisme sel dapat kembali berlangsung optimal. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa *propolis* juga dapat berfungsi sebagai antioksidan kuat, yang dapat mencegah timbulnya senyawa-senyawa radikal bebas. Radikal bebas merupakan penyebab utama munculnya sel-sel kanker atau menimbulkan berbagai gejala penyakit akibat gangguan fisiologi sel tubuh (Kumazawa, 2004).

4. Immunomodulator

Propolis membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh secara alami karena *propolis* kaya akan *bioflavanoid* yang dapat membantu meningkatkan produksi serta aktivitas sel-sel imun, antara lain makrofag (Orsi, 2000).

d. Ekstraks dan Ekstraksi *Propolis*

(1) Definisi

Dalam buku *farmakope* indonesia Edisi 4 disebutkan bahwa ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari *simplisia nabati* atau *simplisia hewani* menggunakan pelarut yang sesuai (Depkes, 2000). Ekstraksi adalah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan atau dikeringkan. Ekstrak mengandung berbagai macam unsur, tergantung pada obat yang digunakan dan kondisi dari ekstraksi (Ansel, 1989).

(2) Cairan Penyari

Pada proses ekstraksi digunakan 2 penyari yaitu air dan *etanol* karena banyak bahan tumbuhan larut dalam air atau alkohol, maka air atau *etanol* menjadi acuan cairan pengekstraksi (Voight, 1995). *Farmakope* Indonesia menetapkan bahwa sebagai cairan penyari adalah air, *etanol*, *etanol*-air atau *eter* (Depkes, 1986). Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria berikut : (Depkes, 2000).

- 1) Selektivitas
- 2) Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
- 3) Ekonomis
- 4) Ramah lingkungan
- 5) Keamanan

Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena: lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, *etanol* dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Untuk meningkatkan penyarian biasanya menggunakan campuran *etanol* dan air. Perbandingan jumlah *etanol* dan air tergantung pada bahan yang disaring. *Etanol* dapat melarutkan *alkaloid basa*, minyak menguap, glikosida, *kurkumin*, *kumarin*, *antrakinon*, *flavonoid*, *steroid*, damar dan *klorofil*. Lemak, malam, *tanin* dan *saponin* hanya sedikit larut. Dengan demikian zat pengganggu yang terlarut hanya sedikit (Depkes, 1986).

Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Keuntungan lain dari *etanol* mampu mengendapkan albumin dan menghambat kerja enzim. Etanol (70%) sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengganggu hanya skala kecil yang turun kedalam cairan pengekstraksi (Voigt, 1995).

Penggunaan *etanol* 70% sebagai pelarut dalam ekstraksi *propolis* berdasarkan penelitian Muli dan Maingi (2007) yang melaporkan bahwa etanol 70% merupakan pelarut yang dapat melarutkan bahan aktif *propolis* paling optimal dibandingkan dengan konsentrasi *etanol* lainnya (30, 50 dan 90%).

